

Vergleichende Untersuchungen über
Pepsinpräparate des Handels

Albert Hellmeier

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität
München

Vorstand: Professor Dr. K. Z i p f

Vergleichende Untersuchungen über

Pepsinpräparate des Handels

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Albert Hellmeier

Tierarzt

aus

Fahrenzhausen

München 1958



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. K. Z i p f

Tag der Promotion: 25. Juli 1958

Verzeichnis

Seite

1. Einleitung	1
2. Historischer Teil	2
a. Begründung	2
b. Übersicht über die wichtigsten Leistungen	3
3. Chronologischer Teil	4
a. Die Zeit	4
b. Die Werke	5
c. Die Persönlichkeit	5
4. Bibliographie	6
5. Zusammenfassung	7
6. Literaturverzeichnis	8
7. Glossar	9

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsangabe

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	2
a. Physiologie	2
b. Überblick über die einzelnen Bestimmungs- methoden	4
3. Experimenteller Teil	9
a. Zur Methodik	9
b. Untersuchte Präparate	19
c. Ergebnisse	22
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	30
6. Literaturverzeichnis	31
7. Lebenslauf	35

1. Einleitung

Für die Behandlung von Magen- und Darmerkrankungen, die mit Störungen der fermentativen Verdauung einhergehen, steht eine große Anzahl von Fermentpräparaten des Handels zur Verfügung. Ihre Wirksamkeit und rationelle therapeutische Anwendung ist in erster Linie abhängig von der Aktivität der darin enthaltenen Fermente. Die meisten Fermente, zu denen auch das Pepsin gehört, sind nur beschränkt haltbar. Mangelhafte Qualität des tierischen oder pflanzlichen Ausgangsmaterials, fehlerhafte Verarbeitung und unzweckmäßige Lagerung können zu wesentlicher Minderung der fermentativen Wirksamkeit führen.

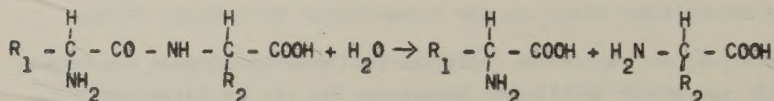
Die Feststellung der peptischen Aktivität von Fermentpräparaten des Handels ist deshalb von großer praktischer Bedeutung. Sie ist vor allem auch wünschenswert bei solchen Präparaten, welche ungenügend deklariert sind.

Für die Pepsinbestimmung ist eine große Anzahl von Methoden empfohlen worden. Die damit bei gleichen Substraten gewonnenen Ergebnisse sind jedoch nur wenig einheitlich. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine Reihe von Pepsinpräparaten des Handels mit verschiedenen bekannten Bestimmungsmethoden zu untersuchen.

2. Allgemeiner Teil

a. Physiologie

Die Aufspaltung der Eiweißkörper im Magen-Darm-Kanal geschieht in mehreren aufeinanderfolgenden bzw. nebeneinander hergehenden Stufen. Zuerst kommt es zu physikalischen Veränderungen der Proteine, die sich in Änderung der Viskosität, der elektrischen Ladung u.a. äußern (61). Die chemischen Vorgänge, d.h. die Aufspaltung der CO-NH-Bindung, können nach RAUEN (63) schematisch wie folgt dargestellt werden:



Die Endprodukte der durch die Magenproteasen verdauten Eiweißkörper sind die Polypeptide. Nach neueren Beobachtungen sollen aber bei länger fortgesetzter Pepsineinwirkung auch größere Mengen von einfachen Eiweißbausteinen entstehen.

Die Freisetzung von Tyrosin wird von Calvery und Schock (15) beschrieben. Harington und Rivers (31), ebenso Damodaran und Krishnan (17) fanden bei Pepsinverdauung von Casein nach siebentägiger Incubation 6% freies Tyrosin.

Auch synthetische Peptide mit niederem Molekulargewicht (z.B. Carbobenzoxy-L-glutamyl-L-phenylalanin) sollen durch kristallisiertes Pepsin zerlegt (25) werden. Buchs führt die Spaltung allerdings auf Kathepsinwirkung zurück, da die optimale Spaltung bei pH 4 stattfand (14).

Die Peptide unterscheiden sich strukturell nach den Untersuchungen von Bergmann und Mitarbeitern (6) je nach Art des zur Wirkung kommenden Ferments. Die einzelnen Proteasen zeigen nämlich eine sehr unterschiedliche Affinität zu bestimmten Peptidbindungen im Eiweißmolekül und unterscheiden sich nicht nur in ihrem pH-Wirkungsbereich. Auf Grund dieser Beobachtungen wurden die Proteasen von Bergmann (7) in Endo- und Exopeptidasen eingeteilt. Endopeptidasen sind die Proteinasen im engeren Sinn. Sie vermögen die Peptidbindungen in der Mitte der Kette des Eiweißmoleküls zu spalten, die durch die Nachbarstellung bestimmter Aminosäuren gekennzeichnet sind (76).

Exopeptidasen sind die Peptidasen im engeren Sinn. Sie spalten Polypeptide an de

freien Kettenenden unter Abspaltung einzelner Aminosäuren (20).

Die Endopeptidase Pepsin ist eine Komponente der Magenprotease. Sie ist in der Magenschleimhaut in inaktiver Vorstufe als Pepsinogen vorhanden und geht in Gegenwart von Wasserstoffionen oder durch Spuren von Pepsin in die aktive Form über (18). Bei diesem Vorgang entsteht ein hemmender Reaktionsanteil oder Inhibitor, der sich mit dem eben gebildeten Pepsin verbindet:



Als Bildungsstätten des Pepsins und seiner Vorstufen wurden die Hauptzellen der Drüsen der Funduschleimhaut festgestellt (45). Die Pepsinsekretion unterliegt der nervösen Regulation durch Sympathicus und Parasympathicus. Histamin führt zu einer verstärkten Ausscheidung von Magensaft und dadurch des Pepsins.

Die Deutung der Wirkungen der Enzyme auf ihre Substrate geht von der Annahme einer Enzym-Substratverbindung aus. Schon V. H e n r i (33) hat von diesem Gesichtspunkte aus zu einer mathematischen Formulierung gewisser Enzymreaktionen gelangen können. Die klassische Arbeit über die Verbindung eines Enzyms mit Substrat und Reaktionsprodukten sind die Untersuchungen von M i c h a e l i s und M e n t e n über die Kinetik der Invertinwirkung (53). Die Wirkung eines Enzyms hängt danach in charakteristischer Weise einerseits von der Konzentration der Enzym-Substratverbindung, andererseits aber auch von der Geschwindigkeit, mit der der Zerfall der Enzymsubstratverbindung unter Rückbildung des freien Enzyms erfolgt, ab.

Das Wirkungsoptimum des Pepsins liegt zwischen 1,5 und 2,5 und ist abhängig von der Lage des isoelektrischen Punktes des zu verdauenden Eiweißes (58). Die stark saure Reaktion wird durch die Salzsäure des Magens hergestellt, der die Pepsinkonzentration weitgehend parallel verläuft. Der Zusammenhang zwischen Säure- und Pepsinwirkung bedarf allerdings noch weiterer Klärung. S p r i n g e r (73) fand eine direkte Abhängigkeit der Eiweißspaltung von den Dissoziationskonstanten der verwendeten Säuren. Schwach dissoziierte Säuren sollen beispielsweise die Verdauung hemmen. Andere Autoren, B o n o r i n o, Z u n i n o und L a c o u r (9) bestreiten ein Ansteigen der Pepsinwirkung durch Säureeinwirkung. Das Temperaturoptimum des Pepsins liegt zwischen 38 und 40° C. Bei 65° C wird das Ferment unwirksam (3). Gehemmt wird die Enzymreaktion durch Spaltprodukte der enzymatischen Reaktion (81, 58, 47) und durch Enzymgifte (47). Das Spaltvermögen des Pepsins erstreckt sich auf alle genuinen Eiweißkörper, wie z.B. Casein, Globin, Kollagen, Elastin und Histone, wenn sie in Form von Eiweißkationen vorliegen. Nicht angegriffen werden Mucin, Ovomucoid und Protamine.

b. Überblick über die verschiedenen Bestimmungsmethoden

Für die Bestimmung der Pepsinaktivität gibt es nach B a m a n n und M y r b ä c k eine ansehnliche Zahl von Methoden. Fast jeder Bearbeiter hat eine eigene Methode entwickelt oder eine bekannte modifiziert.

Unter diesen Verfahren ist zwischen groben Schätzungsmethoden und sehr exakten, quantitativen Methoden zu unterscheiden.

Zu den ersteren gehört die Methode des D.A.B.6. Sie schreibt vor, daß denaturiertes Hühnereweiß durch die salzsaure Lösung des Pepsinpräparates innerhalb einer bestimmten Zeit bis auf wenige weißgelbliche Häutchen gelöst sein muß. Nach der gleichen Methode wird auch die Wertbestimmung des Pepsinweines und nach dem Ergänzungsbuch zum D.A.B.6 von flüssigem Pepsin durchgeführt.

Diese Bestimmungsmethode kann nach E s c h e n b r e n n e r (19) nur als rohe Schätzung angesehen werden, niemals aber als exakte Bestimmungsmethode in quantitativer Hinsicht. Sie kann unter Umständen in der Hand eines Untersuchers, der täglich derartige Prüfungen vornimmt, brauchbar sein. Für die Apothekenpraxis aber, in der relativ selten solche Untersuchungen vorkommen, ist sie unbrauchbar. Man erhält bei gleichem Material oft nicht Übereinstimmende Werte. Auch K ö h r m a n n (40), H o r s c h und K ö n i g (34) sowie B ö r n g e n, G e b l e r und H a u s c h i l d (10) halten die Methode des D.A.B.6 für quantitative Vergleiche für unbrauchbar. M a s c h und H u c h t i n g (49) kommen zu dem Schluß: "Diese subjektive Beurteilung des Versuches führt notwendigerweise zu erheblichen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen verschiedener Beobachter". Sie haben die Mängel der offiziellen Pepsinbestimmungsmethoden zunächst durch Abtrennen, Trocknen und Wägen des unverdauten Eiweißrückstandes zu beheben versucht. Sie erreichen auf diese Weise innerhalb einer Versuchsreihe eine Genauigkeit von $\pm 5\%$. An verschiedenen Tagen jedoch erhöhte sich der Fehler bis auf $\pm 10\%$.

Auch nach der Methode von M e t t (52) wird die Auflösungsgeschwindigkeit fester koagulierter Eiweißkörper bestimmt.

Die Pepsinbestimmung des Schweizer Arzneibuches beruht auf einer von G r o ß angegebenen und von K ä l i n (38) modifizierten Methode. Hierzu läßt man Pepsin unter konstanten Bedingungen auf Casein einwirken. Die Verdauung wird durch ein Eiweißfällungsmittel unterbrochen. Durch Ausflocken des nicht abgebauten Caseins entsteht eine Trübung. Sie darf nicht stärker sein als die einer Vergleichslösung bekannten Caseingehaltes. Auch bei dieser Methode handelt es sich nicht um eine quantitative Gehaltsbestimmung. Es wird nur festgestellt, ob die peptische Verdauungskraft des Fermentpräparates einer

bestimmten Mindestanforderung genügt.

Ähnlich aufgebaut sind die Methoden von G r o ß (29) und M i c h a e l i s (54). Bei ihnen wird die Substratabnahme flüssiger Substrate durch Fällung des nicht abgebauten Eiweißes mit verschiedenen Eiweißfällungsmitteln festgestellt.

Nach dem Britischen Arzneibuch 1953 wird die Verdauung bei 50-52° C durchgeführt. Das nicht gelöste Eiweiß wird abzentrifugiert und volumetrisch gemessen. Eine andere Methode der Britischen Pharmacopoea, dient der orientierenden Pepsinbestimmung. Hierzu wird der salzsauren Pepsinlösung etwas Karminfibrin zugesetzt. Durch Fermentwirkung erfolgt ein Abbau des Fibrins und die Lösung färbt sich rot. Ein gleichzeitig angesetzter Parallelversuch, bei dem das Pepsin durch vorheriges Aufkochen inaktiviert wurde, bleibt farblos.

Auch die Methode für Pepsinbestimmung in den National Formulary IX (57) hat nach W e s s e l m a n n (78) verschiedene Mängel.

Andere Methoden erfassen die proteolytische Spaltung durch quantitative Bestimmung der gebildeten Carboxyl- oder Aminogruppen. S ö r e n s e n (70) mißt den Umfang der Proteolyse nach Zusatz von Formol. Dieses bildet mit den Aminogruppen Methylenverbindungen, die nicht dissoziieren. Auf diesem Wege ist es möglich, die Carboxylgruppen allein zu bestimmen. Der Zuwachs der Carboxylgruppen wird mit Bariumhydroxydlösung titrimetrisch gemessen. W i l l - s t ä t t e r und W a l d s c h m i d - L e i t z (80) bestimmen die Caseinverdauung mittels alkalimetrischer Titration der COOH-Gruppen.

V a n S l y k e (69) mißt die freien Aminogruppen mittels HNO_2 . L i n d e r s t r ö m - L a n g (42) bestimmt die frei gewordenen Aminogruppen und andere basische Gruppen durch Titration mit Säure in acetonischer Lösung. Sehr schöne Ergebnisse erzielten L i n d e r s t r ö m und L a n g mit einem auf der gleichen Grundlage aufgebauten Mikroverfahren (43), bei histochemischen Untersuchungen. Es war damit möglich, enzymatische Vorgänge in Schnitten zu verfolgen (44), die nur wenige Zellen enthielten.

Eine sehr empfindliche Methode zur Bestimmung des Substratschwundes ist die von R o n a und K l e i n m a n n (65) angegebene und von K r i j g s - m a n n (41a) als Mikroverfahren ausgebaute nephelometrische Methode. Das Prinzip der Methode ist folgendes: Optisch klare Eiweißlösungen werden durch Zusatz ebenfalls optisch klarer Fermentlösungen teilweise gespalten. Der nicht gespaltene Eiweißrest wird in stark saurer Lösung durch Sulfosalicylsäure in Form einer homogenen Trübung abgeschieden. Die Konzentration der Trübung wird

nephelometrisch ermittelt. Zum Vergleich dient eine Lösung bekannter Konzentration.

Bei der nephelometrischen Methode nach Buchs (13) wird die Trübung der Eiweißsubstratlösung durch Sulfosalicylsäure mit Hilfe von Gummi arabicum als Schutzkolloid stabilisiert. Zum Vergleich wird eine Lösung mit proportionaler Trübung hergestellt. Danach wird die stattgehabte Proteolyse aus der angelegten Eichkurve nephelometrisch ermittelt.

Schorer (68) verwendet als erster das Refraktometer zur quantitativen Pepsinbestimmung. Er bestimmt nach Pepsineinwirkung die Menge des nicht mehr fällbaren Eiweißes. Kupelwieser (41) hat ebenfalls eine Methode zur Erfassung der proteolytischen Spaltung von Organeieiweiß mittels Refraktometer ausgearbeitet. Eine ähnliche Methode hat Reiss (64) veröffentlicht. Ein einfacheres Verfahren mit Hilfe des Pulfrichrefraktometers gibt Janicki (36) an. Er verwendet als Substrat Serumalbumin. Groll (28) bestimmt die Aktivität von Pepsin mit Hilfe des Eintauchrefraktometers.

Andere Forscher wie Spriggs (72) und Northrop (59) bestimmen durch Ermittlung der Viskositätsänderung den Grad der proteolytischen Verdauung.

Dilatometrische Messungen zur quantitativen Verfolgung von Volumenänderungen in Reaktionssystemen wurden in der Fermentforschung von Benrath (5) und Gallioti (27) angewandt. In neuerer Zeit veröffentlichte Rona und Neuenschwander-Lemmer (66) eine dilatometrische Fermentbestimmungsmethode.

In den letzten Jahren ist neben der Bestimmung des Nichteiweiß-N (60) vor allem die Methode von Anson (2) für die Erfassung rein proteolytischer Wirkungen angewandt worden. Nach dieser Methode werden die aus dem Hämoglobin abgespaltenen Hydrolysenprodukte, die mit Trichloressigsäure nicht fällbar sind, mit dem Phenolreagens von Folin und Ciocalteu (24) kolorimetrisch ermittelt. Die Aktivität wird in Gamma-Tyrosin-N ausgedrückt.

Masch und Huchting (49) erhielten sowohl bei Verwendung von Hämoglobin als auch von Edestin, Casein und Ovalbumin als Substrateiweiß gute Resultate. Wesselmann (78) kommt nach einem Vergleich der Anson-Methode mit der N.F. IX Methode (57) und einer von ihm veröffentlichten Methode zu folgendem Ergebnis: "Die kolorimetrische Bestimmung liefert günstige Ergebnisse. Genaue Ergebnisse werden schnell erhalten." Die Anson-Methode wurde bisher auch von Beazell, Schmidt, Ivy, Monaghan (4) sowie von Bucher, Grossmann und Ivy (12)

benutzt; desgleichen von Hunt (35), der aber statt Hämoglobin Trockenserum anwendete, sowie von White und Bowann (79), die als Substrat Casein verdauten. Auch Groy, Benson jr., Reifensstein (30) sowie Janowitz, Hollander (37), auch Orringer, Lauber und Hollander (62) arbeiteten mit dieser Methode. Die letzteren verwendeten Trockenhä moglobin, der Firma The Armour-Laboratories. Dieses Trockenhä moglobin zeigte mit Pepsin die gleiche Aufspaltbarkeit wie ein von Bucher, Grossmann und Ivy (12) in einem vereinfachten Verfahren hergestelltes Substrat. Mer ten und Rätzer verwendeten Rinder-Hä moglobin-Trockenpulver der Behringwerke mit gleichem Erfolg (51). Nach Courtois und Villiers-Huiban (16) hat die Bestimmung des Tyrosins, die immer eine höhere prozentuale Hydrolyse anzeigt, nur einen begrenzten Wert, da nur die bevorzugte Aufspaltung der Tyrosin enthaltenden Peptidbindungen gemessen wird. Aus einer Arbeit von Wallenfels (77) geht hervor, daß man die Freilegung von Tyrosin und Tryptophan nicht ohne weiteres als Maß für die Proteolyse benutzen kann, insbesondere dann nicht, wenn es sich um einen Vergleich von proteolytischen Fermenten verschiedener Natur handelt.

Bergstermann (8) bestimmt an Stelle der kolorimetrischen Messung von Tyrosin mit dem Phenolreagens die Absorption bei $280\text{ m}\mu$ im Trichloressigsäurefiltrat.

Tomarelli, Charney und Harding (74) unterwerfen ein Azoprotein der Proteolyse. Dabei entstehen gefärbte Spaltprodukte, die in Trichloressigsäure löslich sind. Die Farbintensität des Trichloressigsäurefiltrates ist eine Funktion der proteolytischen Aktivität der Enzymlösung.

Abelin und Pfister (1) verwenden Invertseifen, die nur natives, nicht abgebautes Eiweiß fällen. Eine Lösung von bekanntem Eiweißgehalt wird vor und nach der Verdauung mit einer Seifenlösung titriert. Da jedoch eine vollständige Eiweißfällung nur bei einem bestimmten Verhältnis zwischen Invertseife und Protein eintritt, ist diese Methode weniger geeignet. Nicht zuletzt auch deswegen, weil sich das Maximum der eintretenden Trübung nicht sicher ermitteln läßt. Gute Ergebnisse gibt eine photometrische Methode von Kazmeier und Stahlberg (39).

Speyer (71) arbeitet mit der Agar-Diffusionsmethode. Agar wird mit einer Caseinlösung gemischt und analog dem antibiotischen Lochtest gelocht. In die Löcher gibt man die zu testende Fermentlösung. Nach einer bestimmten

Verdauungszeit überschichtet man das Substrat mit einem Eiweißfällungsmittel. Die Fermentdiffusionszonen heben sich als klar bleibende Bezirke von dem im übrigen Substrat weiß ausfallenden Casein scharf ab. Die Durchmesser der Caseinauflösungsfelder dienen als Maß für die Fermentkonzentration.

C o u r t o i s und V i l l i e r s - H u i b a n (16) verwenden zum Nachweis von Pepsin als Substrat Edestin. Nach einer bestimmten Zeit unterbrechen sie die Verdauung durch Einstellen in Eiswasser. Durch Zugabe von Phytinsäure fällen sie das nicht aufgespaltene Eiweiß. Dann erfolgt die Bestimmung des Gesamt-N nach K j e l d a h l bzw. mittels der Biuret-Reaktion und der Phytinsäure nach M a s s o n im aufgelösten Präcipitat sowie im Überstehenden.

3. Experimenteller Teil

a. Zur Methodik

Die zu untersuchenden Tabletten bzw. Dragées wurden im Mörser fein zerrieben, mit der entsprechenden Menge Aqua destillata versetzt und zur vollständigen Lösung der Fermente 30 Minuten in ein Wasserbad von $37,5^{\circ}$ Celsius gestellt.

Der pH-Wert wurde mit M e r c k - Spezial-Indikatorpapier von pH 0,5 - 5,0 überprüft.

Zur Bestimmung der Pepsinaktivität wurden folgende Methoden angewandt:

1. Methode nach D.A.B.6

Von einem Hühnerei, das 10 Minuten lang in kochendem Wasser gelegen hat, wird nach dem sofortigen Abkühlen in kaltem Wasser das Eiweiß durch ein zur Bereitung von grobem Pulver bestimmtes Sieb gerieben. 10 g dieses zerkleinerten Eiweißes werden in 100 ml Wasser von 50° C und 0,5 ml Salzsäure verteilt; der Mischung wird 0,1 g Pepsin hinzugefügt. Läßt man dieses Gemisch, alle Viertelstunden umschwenkend, drei Stunden lang bei 45° C stehen, so muß das Eiweiß bis auf wenige weißgelbliche Häutchen gelöst sein.

2. Methode nach D.A.B.6 modifiziert nach S. B ö r n g e n, K. G e b l e r und F. H a u s c h i l d

Von einem nicht mehr als 10 Tage alten Hühnerei, das 10 Minuten lang in siedendem Wasser gelegen hat, wird nach sofortigem Abkühlen in kaltem Wasser das Eiweiß durch ein zur Bereitung von grobem Pulver bestimmtes Sieb (Maschenweite 0,75 mm: Nr. 4/DAB 6) gerieben. 10 g dieses zerkleinerten Eiweißes werden in einer Mischung von 100 ml Wasser von 50° C und 0,5 ml Salzsäure gleichmäßig verteilt und 0,1 g Pepsin hinzugefügt. Läßt man dieses Gemisch, alle 15 Minuten umschwenkend, drei Stunden lang bei 45° C stehen, so darf das unverdaute Eiweiß beim Einbringen des Verdauungsansatzes in einen 100 ml-Meßzylinder nach 30 Minuten Absitzen nicht mehr als 5 ml Volumen einnehmen.

3. Methode der Pharmacopoea Helvetica, 5. Ausgabe

Zur Prüfung der proteolytischen Wirksamkeit des Pepsins benützt man eine Kaseinlösung, eine Kasein-Vergleichslösung und eine Pepsinlösung, welche in folgender Weise herzustellen sind:

Kaseinlösung: 0,100 g Kasein wird in ein trockenes Meßkölbchen von 50 ml Inhalt gegeben und durch Anschütteln mit wenig Wasser aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wird mit 25 ml Wasser verdünnt und unter Umschwenken mit 1 ml 0,1 n-NaOH versetzt. Das Kasein wird unter Erwärmen auf 40° C durch Umschwenken, unter Vermeidung von Schütteln, gelöst (was nicht länger als 1/2 Stunde erfordern soll). Die Lösung verdünnt man mit 15 ml Wasser, läßt ohne Umschwenken 2,6 ml n-Salzsäure in das Kölbchen fließen, schwenkt dann rasch um, bis sich das ausgefallene Kasein wieder gelöst hat und ergänzt nach dem Abkühlen auf gewöhnliche Temperatur mit Wasser auf 50 ml.

Kasein-Vergleichslösung: 4 ml der obigen Kaseinlösung (genau gemessen) werden in einem Meßkölbchen von 100 ml Inhalt mit 50 ml Wasser verdünnt, mit 2,3 ml n-Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 100 ml ergänzt.

Pepsinlösung: 0,100 g Pepsin werden auf eine Mischung von 5 ml Wasser und 5 ml 0,1 n-Salzsäure, die sich in einem Schälchen befinden, aufgestreut. Man läßt ruhig stehen, bis das Pulver sich gelöst hat bzw. untergesunken ist. Dann wird die Mischung mit Wasser verlustlos in einen 1-Liter Meßkolben gespült und mit Wasser auf 1 Liter ergänzt.

Wertbestimmung: In einem dickwandigen Reagenzglas von ca. 13 mm innerer Weite mit Glasstopfen mischt man 5 ml der Kaseinlösung mit 3,8 ml Wasser und 1,2 ml der frisch hergestellten Pepsinlösung, stellt das Gemisch in ein konstantes Wasserbad von 40° C und beläßt es dort während einer Stunde. Nach dieser Zeit wird die Verdauung durch Zugabe von 0,3 ml Natriumacetatlösung unterbrochen. Gleichzeitig mischt man, ohne zu schütteln, in einem zweiten, gleich weiten Reagenzglas 10 ml Kasein-Vergleichslösung mit 0,3 ml Natriumacetatlösung (Vergleichstrübung). Das Reagenzglas wird mit der verdauten Kaseinlösung nun ca. 4 Minuten lang in Wasser von gewöhnlicher Temperatur eingestellt. Vergleicht man dann binnen drei Minuten die beiden Reagenzgläser, so soll die Trübung beider Proben gleich stark sein (Vergleichstrübung).

4. Methode nach der Pharmacopoea Helvetica,
modifiziert nach W. Horsch und K. König

In gleich weiten Reagenzgläsern werden je 5 ml Kasein-Stammlösung, 3,8 ml Citratpuffer vom pH 1,3 und 1,2 ml Pepsin-Verdünnung gemischt und diese Verdauungsansätze (pH 1,6) für 2 Stunden in ein Wasserbad (Thermostat) von 40° C gebracht. Danach werden zur Unterbrechung der Verdauung und Fällung des nicht abgebauten Kaseins 0,6 ml Natriumacetatlösung zugegeben. Gleichzeitig wird in Reagenzgläsern, deren Weite mit der der Verdauungsgläser übereinstimmt, aus jeweils 10 ml Kasein-Vergleichslösung 0,3 ml Natriumacetatlösung und 0,3 ml Wasser die Vergleichstrübung hergestellt. Die Verdauungsansätze werden durch Einstellen in Wasser auf Zimmertemperatur gebracht und nach weiteren 3 Minuten Wartezeit mit den Vergleichstrübungen verglichen und der zugehörige Wert ermittelt. Die Beobachtung geschieht von oben gegen einen schwarzen Untergrund bei seitlich einfallendem Licht.

Erforderliche Lösungen:

Pepsin-Verdünnung

Natriumacetatlösung: 27,2 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ werden mit Wasser zu 100 ml gelöst.

Citratpuffer: pH 1,3 (nach Sörensen) 15,9 ml Natriumcitratlösung werden mit 84,1 ml 0,1 n-Salzsäure gemischt.

Natriumcitratlösung (für Citratpuffer) 10,504 g Citronensäure werden in 100 ml n-Natronlauge gelöst und mit Wasser auf 500 ml gebracht.

Kaseinstammlösung: Herstellung wie bei der Methode des Schweizerischen Arzneibuches. Jeder Verdauungsansatz enthält 5 ml dieser Lösung = 10 mg Kasein; dies wird gleich 100 % Substrat gesetzt.

Kaseinvergleichslösung 8 %: 4 ml der Kasein-Stammlösung werden in einem Meßkölbchen von 100 ml Inhalt mit 50 ml Wasser verdünnt, mit 2,3 ml 1 n-Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 100 ml ergänzt. 10 ml dieser Vergleichslösung enthalten 0,8 mg Kasein; eine dieser Konzentration entsprechende Trübung des ursprünglich 10 mg enthaltenden Verdauungsansatzes entspricht demnach 0,8 mg = 8 % nicht abgebautem Kasein.

Kaseinvergleichslösung 12 %: 6 ml der Kaseinstammlösung werden, wie unter Kaseinvergleichslösung 8 % beschrieben, jedoch unter Verwendung von 2,2 ml 1 n-Salzsäure zu 100 ml verdünnt. 10 ml dieser Vergleichslösung enthalten 1,2 mg Kasein; eine dieser Konzentration entsprechende Trübung des Verdau-

ungsansatzes entspricht 1,2 mg = 12 % nicht abgebautem Kasein.

Kaseinvergleichslösung 16 %: 8 ml der Kaseinstammlösung werden, wie unter Kaseinvergleichslösung 8% beschrieben, jedoch unter Verwendung von 2,1 ml 1 n-Salzsäure zu 100 ml verdünnt. 10 ml dieser Vergleichslösung enthalten 1,6 mg Kasein; eine dieser Konzentration entsprechende Trübung des Verdauungsansatzes entspricht 1,6 mg = 16 % nicht abgebautem Kasein.

Weitere Vergleichslösungen können bei Bedarf sinngemäß nach dem Vorbild der angegebenen Vorschrift hergestellt werden.

5. Methode nach M. L. A n s o n, modifiziert nach

R. M e r t e n und H. R a t z e r

1. Herstellung der Hämoglobinlösung:

a) aus frischem Rinderblut: Dieses wird am besten mit einem Holzstab sofort bei der Gewinnung geschlagen, der defibrinierte Anteil durch einen Gazestreifen abfiltriert und etwa 20-30 Minuten zentrifugiert. Das Überstehende Serum wird mit den weißen Blutkörperchen möglichst vollständig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die im Niederschlag enthaltenen roten Blutkörperchen werden 2-3mal mit dem 3-4-fachen Volumen einer 1%igen NaCl-Lösung vermischt und wieder abzentrifugiert. Beim ersten Auswaschen setzen sich diese schon nach etwa 20 Minuten vollständig ab, beim 2. und 3. Mal muß etwa 45 Minuten zentrifugiert werden. Nach dem Absaugen der Waschflüssigkeit werden die roten Blutkörperchen in Dialysierschläuchen (Zellophandärme der Fa. K a l l e & C o., Wiesbaden-Biebrich, Durchmesser 30-35 mm) gegen fließendes Leitungswasser 12-24 Stunden dialysiert. Dabei ist von Zeit zu Zeit der Inhalt gut durchzumischen, damit die Dialyse gut vonstatten geht. Dies ist erkennbar am Verschwinden der Lackfarbe und daran, daß im Trichloressigsäurefiltrat mit dem Phenolreagens keine Blaufärbung mehr nachgewiesen werden kann. Die Hämoglobinlösung wird dann in paraffinierten Papierbechern (Eiscremebecher) oder in Porzellantieglern nach Verschuß mit gehärteten Filtern eingefroren. Hierfür eignen sich die Eisfächer der elektrischen Kühlschränke. Um bakterielle Verunreinigungen zu vermeiden, muß möglichst sauber und steril gearbeitet werden. Das eingefrorene Hämoglobin hält sich monatelang. Vor Gebrauch muß das eingefrorene Hämoglobin vorsichtig aufgetaut werden, indem der Behälter in Wasser von Körpertemperatur gestellt wird. Um Konzentrationsunterschiede zu vermeiden, muß

immer vollständig aufgetaut werden.

Der P r o t e i n (Globulin)-gehalt wird nach der Formel:

$$\frac{\text{Trockengewicht}}{(\text{Feuchtgewicht minus Trockengewicht}) \text{ plus } (0,73 \text{ mal Trockengewicht})}$$

bestimmt. Hierzu werden in einem ausgeglühten Porzellantiegel oder in einem Wägegläschen 1-2 ml Hämoglobinlösung eingewogen und bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Proteingehalt schwankt zwischen 22 und 23 %.

b) aus Hämoglobin-Trockenpulver: Wesentlich einfacher ist die Verwendung eines von den B e h r i n g w e r k e n, Marburg, hergestellten Hämoglobin-Trockenpulvers. Dieses Pulver wird aus Rinder-Hämoglobin hergestellt, ist gut in Wasser löslich (unlöslicher Rückstand 0,4%) und enthält wenig Restfeuchtigkeit (bis zu 1%). Dieses Präparat ist dialysiert. Der Globinanteil des Hämoglobins beträgt nach T u l l i s (75) 96 %.

2. Herstellung der Substratlösungen:

Die aus dem Hämoglobin-Trockenpulver hergestellte und filtrierte Hämoglobinlösung wird mit destilliertem Wasser verdünnt, bis der Proteingehalt 2,5 Gewichtsprozent entspricht. Es wurde das Hämoglobin-Trockenpulver der B e h r i n g w e r k e verwendet. Dann wird durch S c h l e i - c h e r und S c h ü l l - Filter 1017 1/2 filtriert. 4 Teile dieser Lösung werden mit einem Teil einer 0,3 n-HCl versetzt; der pH Wert beträgt 1,8.

3. Herstellung des Phenol-Reagens nach F o l i n und C i o c a l t e u (24):

Man überträgt 100 g Natriumwolframat $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 25 g Natriummolybdat $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zusammen mit 700 ml Wasser in eine 1500 ml Schliffkolbenflasche. Man fügt 50 ml 85%ige Phosphorsäure und 100 ml konzentrierte HCl (spez. Gew. 1,19) hinzu und hält nach Aufsetzen eines Rückflußkühlers das Gemisch 10 Stunden bei gelindem Sieden. Nach Beendigung des Kochens fügt man 150 g Lithiumsulfat, 50 ml Wasser und einige Tropfen Bromwasser hinzu. Man kocht die Mischung ohne Rückfluß-

kühler ungefähr 10 Minuten, um das überschüssige Brom zu entfernen. Man kühlt ab, verdünnt mit Aqua dest. auf einen Liter und filtriert. Die Lösung hat eine goldgelbe Farbe. Sie darf keinen grünlichen Farbton enthalten, sonst muß erneut unter Zugabe von 1-3 Tropfen Brom aufgekocht werden, da sonst blaue Reduktionsprodukte in ihr enthalten sind, welche die Proportionalität zwischen Extinktion und Tyrosin- bzw. Tryptophangehalt stören. Das Reagens soll gut gegen Staub geschützt in einer braunen Flasche aufbewahrt werden, da organisches Material allmählich leichte Reduktionen hervorruft. Vor der Verwendung wird das Reagens mit der doppelten Menge Aqua dest. verdünnt.

4. Fermentwirkung:

Ferment und Substrat werden zuerst im Thermostaten auf $37,5^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt. Dann werden 5 ml Substratlösung mit Vollpipetten in Reagenzgläser einpipettiert und für die Filtration Reagenzgläser mit Glastrichtern (Durchmesser 5,5 cm) und Filtern (S c h l e i c h e r und S c h ü l l 598, Durchmesser 7 bzw. 9 cm) bereitgestellt. Zu 5 ml Substrat wird 1 ml verdünnte Fermentlösung hinzugegeben. Nach Zugabe der Fermentlösung wird gut durchgemischt und in ein Wasserbad von $37,5^{\circ}\text{C}$ gestellt. Nach genau 10 Minuten wird durch Zugabe von 10 ml einer genau 0,3 n-Trichloressigsäure aus einer 100 ml Bürette die Fermentwirkung unterbrochen. Nach etwa 5 Minuten wird in die bereitgestellten Reagenzgläser filtriert. Vom Filtrat werden 5 ml in 50 ml Erlenmeyer-Kolben pipettiert und 10 ml einer 0,5 n-NaOH zugegeben. Jetzt wird die Farbmessung, d.h. die Bestimmung der Blaufärbung, die Tyrosin und Tryptophan mit dem Phenolreagens von F o l i n und C i o c a l t e u ergeben, ausgeführt. Zum obigen Ansatz aus 5 ml Filtrat und 10 ml 0,5 n-NaOH werden aus einer 3 ml Vollpipette gleichmäßig tropfend unter langsamem Schütteln 3 ml Phenolreagens gegeben. Die entstehende Blaufärbung wird 3-12 Minuten nach Zugabe des Reagens kolorimetriert, da nur innerhalb dieser Zeitspanne eine konstante Farbtiefe besteht. Hierzu wird bei der Bestimmung mit dem Stufenphotometer das Rotfilter S75, für die Bestimmung mit dem Leitz-Photometer Filter 620 benutzt, sowie eine Küvette mit 10 mm Schichtdicke. Der Farbwert des Phenolreagens wird beim STUFO kompensiert, indem gegen einen Reagentienleerwert, bestehend aus 5 ml einer Trichloressigsäuremischung (aus 10 ml 0,3 n-Trichloressigsäure und 6 ml Wasser) 10 ml 0,5 n-NaOH und 3 ml Phenolreagens gemessen wird. (Bei Verwendung des Tyrosinstandardest wird ein entsprechender An-

satz mit Tyrosin hergestellt.)

Die hierzu notwendige Eichkurve wird aus Verdünnungen einer m/1000 Tyrosinlösung (181 mg Tyrosin in 10 ml 1/10 n-HCl, mit 10 ml 1/10 n-NaOH neutralisiert und ad 1000 mit Aqua dest. aufgefüllt, Zusatz von 2 Tropfen Toluol) hergestellt. Diese Lösung ist nur begrenzte Zeit im Kühlschrank haltbar. Sie enthält in 1 ml 14 Gamma Tyrosin-N. Es werden folgende Verdünnungen hergestellt:

Verdünnung	1	2	3	4	5	6	7
1/1000 m-Tyrosinlösung	0	1	2	3	4	5	6 ml
Aqua dest.	6	5	4	3	2	1	0 ml
0,3 n-Trichloressigsäure	10	10	10	10	10	10	10 ml

Zu 5 ml jeder Verdünnung werden wie bei der sonstigen Farbbestimmung 10 ml 0,5 n-NaOH und 3 ml Phenolreagens hinzugefügt. Wir haben somit die gleichen Verdünnungen wie in dem weiter unten erläuterten Substrat-Wasser-Leerwert, Substrat-Enzym-Leerwert und Verdauungswert. Die erhaltenen Kurvenpunkte 1-7 entsprechen den Farbwerten für 0, 14, 28, 42, 56, 70 und 84 Gamma-Tyrosin-N. Die Kurve der Extinktionswerte ist eine Gerade, deren Steigungsfaktor berechnet werden kann, um durch Division der Extinktion mit diesem Faktor die dem Farbwert äquivalente Menge Tyrosin-N zu erhalten (Abb. 6). Bei Änderung des Phenolreagens empfiehlt sich eine Kontrolle der Eichkurve. Die Farbmessung muß im Anschluß an die Verdauung ohne längeren Zwischenraum, d.h. am gleichen Tage vorgenommen werden.

Bei Verwendung des Photozellenkolorimeters nach Havemann wird als Lichtquelle am vorteilhaftesten die Natriumlampe, mit der hierfür angegebenen Filterkombination aus VG 3 und OG 2 sowie die 5 mm Küvette verwendet. Mit diesen Meßgeräten lassen sich Werte bis zu 50 Gamma Tyrosin-N im Ansatz messen.

Wir verwendeten zur Farbmessung das Zeiss - Spektral-Photometer PMQ II bei der Wellenlänge 620 m μ .

Zur Erfassung der Hämoglobinspaltung ist die Messung folgender Werte erforderlich:

1. Zur Kontrolle des Substrates der Substrat-Wasser-Leerwert (SWL, von Anson als Water-blanc bezeichnet). Er setzt sich zusammen aus 5 ml Hämoglobinsubstrat und 1 ml Wasser, die mit 10 ml Trichloressigsäure versetzt werden. Im Filtrat sollen möglichst kei-

ne farbbildenden Substanzen enthalten sein. Dies trifft bei genügender Dialyse des Hämoglobins auch zu. Bei $37,5^{\circ}\text{C}$ kommt es nach einer Stunde zu einer geringen Zunahme an farbbildenden Substanzen, die aber im

2. Substrat-Enzym-Leerwert (SEL, blanc) enthalten sind. Dieser setzt sich zusammen aus 5 ml Substratlösung und 1 ml Enzymlösung, die sofort in 10 ml Trichloressigsäure gegeben werden, um jede Fermentwirkung zu verhindern.
3. Der Verdauungswert (VW), der sich wie der SEL zusammensetzt, wird erst nach der Fermenteinwirkung enteiweißt.

Wenn der Gehalt der Trichloressigsäurefiltrate des SEL und auch des VW an farbbildender Substanz zu gering ist, kann eine exakte Messung nur dann erfolgen, wenn eine Grundkonzentration zugegeben wird.

A n s o n gibt stets einen ml einer Tyrosin-Standard-Lösung hinzu, die 0,0112 mg Tyrosin-N in 5 ml einer 0,2 n-HCl enthält (0,0008 Milläquivalent Tyrosin entsprechend einer $1/6250$ m Tyrosinlösung).

Hierdurch wird das Gesamtvolumen von 18 auf 19 ml erhöht, so daß bei der Berechnung mit $19/18$ multipliziert werden muß.

5. Methode von M.L. A n s o n, modifiziert von H. B e r g s t e r m a n n

Diese Methode lehnt sich eng an die von M.L. A n s o n angegebene an. Als Substrat wird auch hier dialysiertes Trocken-Hämoglobin der B e h r i n g - Werke verwendet. Die Ansätze werden genau so durchgeführt wie in der Methode 4 beschrieben. Nach Unterbrechung der Fermentwirkung durch 0,3 n-Trichloressigsäure wird filtriert. Jetzt wird aber nicht das Tyrosin mit dem Phenolreagens kolorimetrisch ermittelt, sondern lediglich die Durchlässigkeit im Trichloressigsäurefiltrat bei 280 m μ gemessen. Wir verwenden das Z e i s s - Spektralphotometer PMQ II.

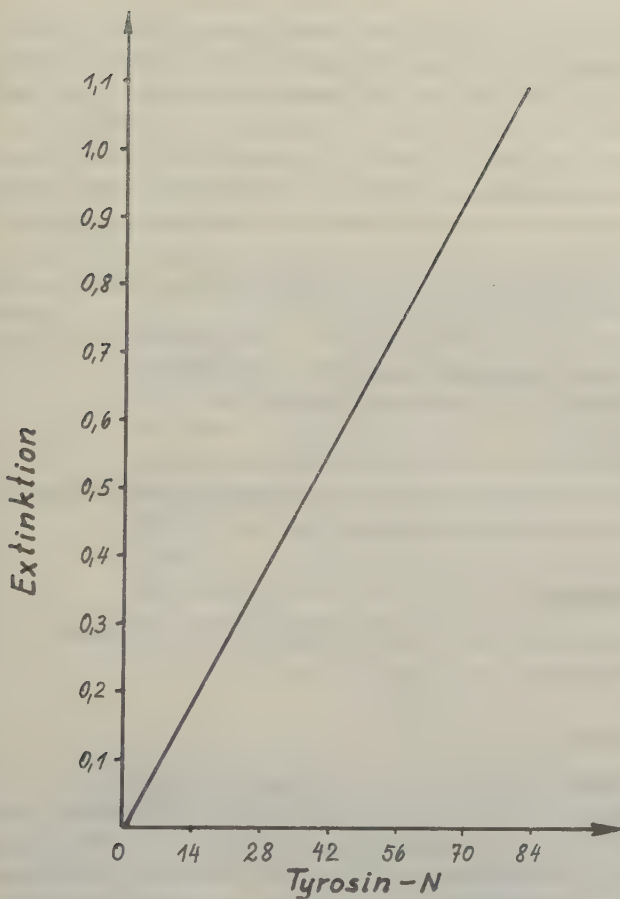


Abb.6: Eichkurve für Methode nach ANSON.

6. Methode von R. Tomarelli, J. Charney

1. Herstellung von sulfanilsaurem Azoalbumin:

Lösung A: 50 g Albumin (wir verwendeten Albumen ovi siccum Erg.B.6 Riedel - de Haen A.-G. Seelze bei Hannover; es können auch andere Albumine verwendet werden) werden in einem Liter Wasser gelöst. Falls nicht alles Albumin gelöst ist, muß filtriert werden. 10 g NaHCO_3 werden in 100 ml Wasser suspendiert und unter Umrühren hinzugefügt.

Lösung B: 0,025 Mol Sulfanilsäure werden in Wasser gelöst, das 0,025 Mol NaOH (5,0 ml einer 5,0 n-NaOH) enthält, 0,025 Mol NaNO_2 werden hinzugefügt. Man rührt drei Minuten um und fügt 0,025 Mol (5 ml einer 5 n-HCl) HCl hinzu. Die Lösung wird zwei Minuten gerührt. Jetzt gibt man zur Lösung A 0,025 Mol NaOH, rührt gut um und gießt unter kräftigem Umrühren die Lösung B hinzu. Das Gemisch wird fünf Minuten umgerührt und dann gegen kaltes Leitungswasser über Nacht dialysiert. Die dialysierte Lösung wird dann lyophilisiert. Das Absorptionsmaximum der Azoalbuminlösung 1:200 liegt bei 430 m μ . Das Maximum der von Tomarelli et al. hergestellte Albumine liegt zwischen 440 und 450 m μ . Dasselbe Maximum wurde auch für die Verdauungsprodukte festgestellt. Das Albumin ist im Puffer pH-Bereichen unter 3 und über 5 löslich.

2. Fermentlösung:

Die Fermentpräparate werden mit 0,3 n-Salzsäure-Natriumcitrat-Puffer verdünnt. Der pH-Wert beträgt 1,6.

3. Substratlösung:

Das Azoalbumin wird im 0,3 n-Salzsäure-Natriumcitrat-Puffer zu einer Konzentration von 25 mg/ml gelöst.

4. Fermentwirkung:

1 ml der Substratlösung wird in ein Reagenzglas pipettiert. 1 ml der verdünnten Enzymprobe wird hinzugefügt und die Mischung 30 Minuten bei 38° C der Verdauung ausgesetzt. Dann wird die Verdauung unterbrochen und das unverdaute Substrat durch 8 ml einer 5%igen Trichloressigsäure gefällt. Jetzt wird der Inhalt eines jeden Reagenzglases filtriert. Zu 5 ml Filtrat werden 5 ml 0,5 n-NaOH gegeben und die Farbintensität mit einem photoelektrischen Colorimeter (430 m μ) gemessen. Jede Bestimmung wird in zweifacher Ausführung angesetzt und sowohl Substrat als auch Fermentlösung vor der Verdauung auf 38° C vorgewärmt. Außerdem wird eine Leerprobe durchgeführt, indem man 1 ml Enzymlösung zu 1 ml Substratlösung fügt, die Verdauung sofort unterbricht und dann in derselben Weise wie die Verdauungsproben behandelt. Der Substrat-Puffer-Leerwert ist im Substrat-Enzym-Leerwert enthalten.

Die Aktivität des Enzymsaftes wird in der Geschwindigkeitskonstanten

der enzymatischen Reaktion

$$K = \frac{1}{t} 2,3 \log \frac{c_1}{c_2}$$

ausgedrückt, wobei c_1 und c_2 die Anfangs- und Endwerte der Proteinkonzentration darstellen.

Da die Beziehung zwischen Farbkonzentration von Azoalbumin und seinen Verdauungsprodukten dem Beerschen Gesetz folgt, können die Werte der optischen Dichte für c -Werte eingesetzt werden. Die Anfangskonzentration von c_1 ist bestimmt durch 5 ml einer 1:200-fachen Verdünnung der Substratlösung, der 5 ml 0,5 n-NaOH zugefügt wurden. Der Wert der optischen Dichte wird mit 20 multipliziert, um den c_1 -Wert zu erhalten, da die unverdaute Probe 20mal stärker ist als die Filtratproben. Der c_2 -Wert wird erhalten durch Abziehen der optischen Dichte des Trichloressigsäurefiltrates vom c_1 -Wert. Dies ist möglich, da eine völlig verdaute Lösung von Azoalbumin (kein Niederschlag mit Trichloressigsäure!), dieselbe Farbintensität aufweist wie eine unverdaute Probe.

b. Untersuchte Präparate:

Name	Hersteller	deklarierte Pepsinmenge
Acidol-Pepsin	Bayer Leverkusen	0,1 gr/Tabl.
Acrustin	"Atmos" Fritzsching und Co GmbH, Viernheim/Hessen	
Arbuz	Dr. Schwab GmbH München 8	
Combizym	Luitpold-Werk München	
Dymal	C.F.Boehringer und Söhne, Mannheim	

Name	Hersteller	deklarierte Pepsinmenge
Enzym Grandelat	Keimdiät GmbH Augsburg	
Enzymo-Drage- letten	Arzneimittelwerk Fischer Bühl Bd.	0,1 gr/ Drag.
Enzynorm	Nordmark-Werke GmbH Hamburg Werk Ütersen	
Enzypan	Deutsche Pharm. Ge- sellschaft Norgine Marburg/Lahn	0,004 gr/ Drag.
Eupept	IFAH GmbH, Hamburg 21	
Idoferm	Hor-Fer-Vit Pharm. Fabrik Oldenburg	495 mg/ Drag. DAB6
Intacid-Säure- Tropfen	Sivoka Pharmazeutica Brannenburg, Waching	
Intestiflor	Dr. Gg. Henning Berlin-Tempelhof	
Kathepzym	Amol-Werk, Hamburg HeViFerm-Laborato- rium GmbH	
Okipan	Röhm und Haas GmbH Darmstadt	Protease- E-Tabl.180
Okizym	Röhm und Haas GmbH Darmstadt	Protease- E-Tabl.650
Panpeptal	Dr. Christ, Brunnen- gräber, Lübeck	
Pantozym	Dr.A. Wander A.G. Bern, IKS-OICM	
Panzynorm	Nordmark-Werke GmbH Hamburg Werk Ütersen	Magenextr./ Drag. 0,100 g

N a m e	Hersteller	deklarierte Pepsinmenge
Pepsaldrä-Pepsin- Salzsäure-Dragees	Karl Engelhard, Frankfurt a.M.	0,12 gr/ Drag.
Pepsimuriat	A.G.F.Med. Produkte Berlin-N 65	0,2 gr DAB6/ Tabl.
Pepsin-Merck	Merck AG Darmstadt	D.A.B.6 1:3500
Pepsin-Glyzerin- Grübler	Chem. Fabrik Bram GmbH Berlin-Lichterfelde	Peps.Liquid. Erg.-B 6
Pepsin-Salzsäure- Dragees "Hageda"	Hageda A.G. Köln a.Rhein	
Pepsinum-pulv. solubile	Merck A.G. Darmstadt	D.A.B. 6
Pepsinwein	Blücher-Schering und Co., Lübeck	D.A.B. 6
Pepsinwein-Subin	Subin-Vertrieb Schepker und Co.	D.A.B. 6
Peptovin	J.S.N. GmbH Bissendorf/Hessen	
Pherapept	Chem. Fabrik Jade GmbH, Hamburg 20	

c. Ergebnisse:

1. Nach der DAB-6-Methode

Der vorgeschriebene Grad der Verdauung wurde nur mit Pepsinwein und Pepsinum-pulv.-Merck erreicht. Die Auflösung des Eiweißes mit Pepsin-Glyzerin-Grübler und mit Acidol entsprach nicht den Anforderungen des DAB 6. Eine noch geringere Aktivität wiesen Pepsinmuriat, Acidol-alt und Peptovin auf.

2. Methode nach DAB-6, modifiziert nach BÖRNGEN (10)

Um eine genauere Auskunft über die proteolytische Wirksamkeit der Fermentpräparate geben zu können, wurde ihre Aktivität auch mit dieser Methode geprüft. Das nicht abgebaute Eiweiß wurde in Meßzylindern gemessen. Zum Vergleich wurde der Eiweißrückstand der pepsinverdauten Probe gleich 100 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Dabei zeigte sich, daß Pepsinwein 94,29%, Acidol 85,72%, Pepsin-Glyzerin-Grübler 77,15%, Pepsimuriat 42,86%, Acidol alt 39,43% und Peptovin 11,43% des vorgelegten Hühnereiweißes verdauten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

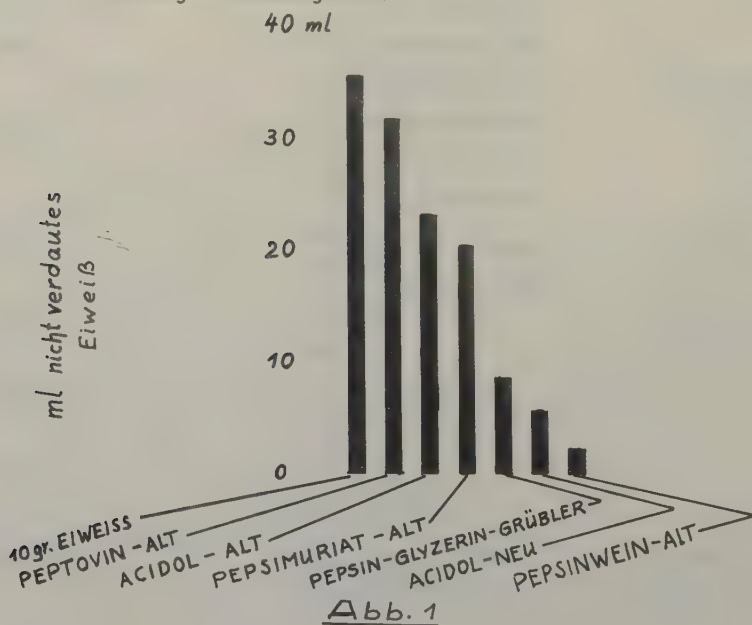


Abb.1: Ergebnisse der Methode nach BÖRNGEN

3. Methode der PHARMACOPAEA HELVETICA V:

Die vorgelegte Menge Casein (0,01 g) wurde, obwohl die doppelte Menge Pepsin (0,00024 g) verwendet wurde, in keinem Fall verdaut.

4. Methode der PHARMACOPAEA HELVETICA V, modifiziert nach HORSCH und KÖNIG (34):

Hier war es möglich, das abgebaute Eiweiß in % des vorgelegten Substrat-Caseins mit Hilfe von Casein-Vergleichslösungen zu ermitteln. Pepsinwein verdaute 89%, Pepsinum-pulv.-Merck 86%, Acidol 67%, Pepsin-Glyzerin-Grübler 70%, Pepsimuriat 52%, Acidol alt 49% und Peptovin 40% des vorgelegten Caseins.

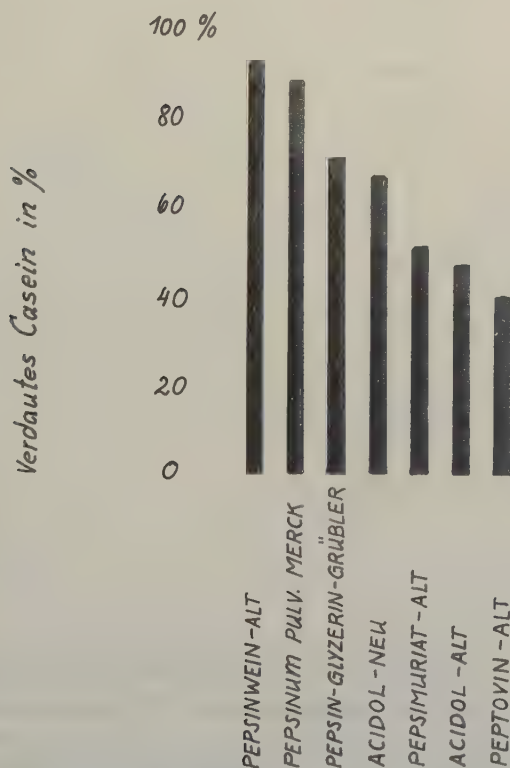


Abb 2

5. Methode von ANSON:

Da die Vorschrift des DAB 6 über Prüfung und Wertbestimmung des Pepsins völlig veraltet und überholt ist (19) und auch die Methode der PHARMACOPOEA HELVETICA V keine quantitative Erfassung des Pepsins ermöglicht, wurde nach einer neueren und genaueren Methode für die Bestimmung der Pepsinaktivität gesucht. Wir wählten die kolorimetrische Methode von ANSON, modifiziert nach RATZER (51). Zum Vergleich des Fermentgehaltes der verschiedenen Handelspräparate wurde dieser jeweils auf 5 ml bei flüssigen Präparaten, 100 mg bei Pulvern und auf 1 Tablette bzw. 1 Dragée bezogen und in Gamma-Tyrosin-N angegeben. Die Umrechnung der Extinktion in Gamma-Tyrosin-N erfolgte mittels einer Eichkurve (Abb. 6).

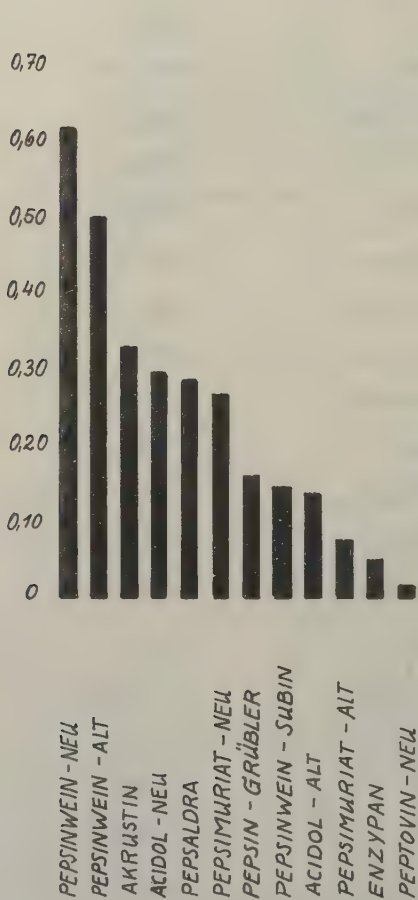
Präparat	Abgabeform	Gamma-Tyrosin-N
Enzynorm	1 Dragée	16088,6
Pepsin-Glyzerin-Grübler	1 ml	6135,0
Pepsinwein	5 ml	2415,0
Pepsimuriat	1 Tablette	2203,0
Pepsinwein alt	5 ml	1915,0
Pepsinum pulv. Merck	100 mg	1520,0
Pepsaldrä	1 Dragée	1296,0
Acidol	1 Tablette	1135,0
Hageda	1 Dragée	974,0
Pepsimuriat alt	1 Tablette	960,0
Pepsinwein-Subin	5 ml	558,5
Acidol alt	1 Tablette	527,0
Acrustin	100 mg	435,6
Panpeptal	1 Dragée	267,7
Peptovin	5 ml	19,5
Enzypan	1 Dragée	7,8
Peptovin alt	5 ml	0,0
Intacid	5 ml	0,0
Pherapept	5 ml	0,0

6. ANSON - Methode, modifiziert von BERGSTERMANN

Außerdem wurden die Fermentpräparate auch nach der modifizierten Anson-Methode von Bergsternmann auf ihren Pepsingehalt untersucht. Hier wird die Durchlässigkeit des Trichloressigsäurefiltrates bei 280 m μ gemessen. Es wurden dieselben Ergebnisse erhalten wie bei der kolorimetri-

schen Methode nach A n s o n, modifiziert von M e r t e n und R a t z e r.

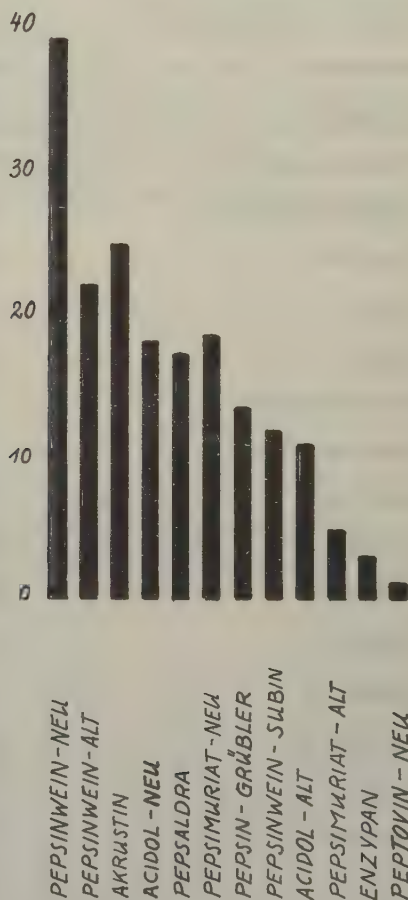
Vergleiche hierzu die Abbildung 3 und 4.



EXTINKTION

Abb. 3

Abb.3: Ergebnisse nach der ANSON-Methode



DURCHLÄSSIGKEIT (%)

Abb. 4

Abb.4: Ergebnisse nach der Methode von BERGSTERMANN

7. Methode nach TOMARELLI, CHARNEY und HARDING

Zum Schluß wurden die Handelspräparate auch noch nach der von Tomarelli, Charney und Harding veröffentlichten Methode untersucht.

Die flüssigen Präparate wurden 1:10 und die Tabletten bzw. Dragées 1:20 verdünnt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 zusammengefaßt.

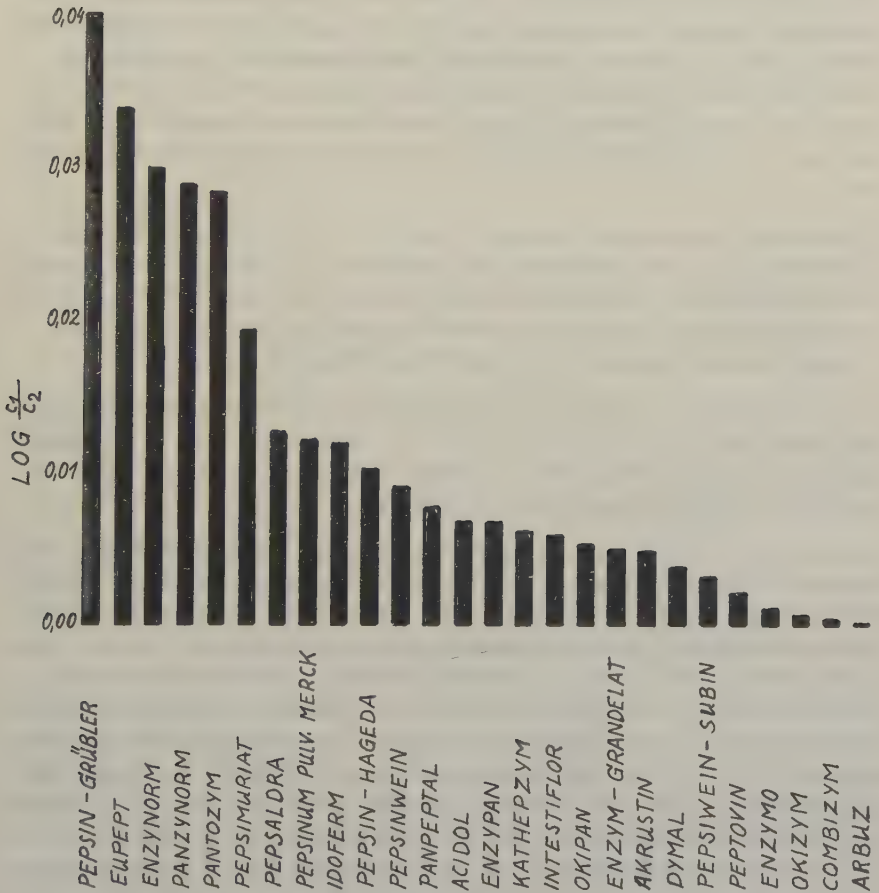


Abb. 5

Abb.5: Ergebnisse nach der Methode von TOMARELLI

D i s k u s s i o n

Die untersuchten Fermentpräparate des Handels weisen eine verschiedene peptische Aktivität auf. Die Ergebnisse zeigen, daß die Verdauungskraft durch längere Lagerung geringer wird. Aus der großen Anzahl der Methoden ersieht man, daß es anscheinend eine allgemein anwendbare, sichere Methode nicht gibt. Dies liegt vor allen Dingen daran, daß die Kinetik der Pepsinwirkung, d.h. die Geschwindigkeit der Hydrolyse stark von der Art der Konzentration und dem Reinheitsgrad der Präparate abhängt. Man müßte demnach für jedes Präparat eine eigene Eichkurve aufstellen. Demzufolge gibt es auch keine Pepsin-Einheiten, die, wie bei anderen Enzymen, einer allgemeinen Anwendung fähig sind, wenn auch bei vielen Methoden eigene, empirische Einheiten aufgestellt worden sind.

Die Methoden des Deutschen und Schweizerischen Arzneibuches sind für quantitative Beurteilung der Pepsinpräparate unbrauchbar. Mit ihrer Hilfe kann keine Gehaltsbestimmung durchgeführt werden. Es kann nur festgestellt werden, ob die Präparate einer bestimmten Mindestanforderung genügen. Man erhält sehr oft nicht Übereinstimmende Werte. Der Fehler beträgt bis zu 20 %.

Für vergleichende Untersuchungen ist die Methode der Pharmacopoea Helvetica V modifiziert von H o r s c h und K ö n i g brauchbar, da das nicht abgebaute Casein mit Vergleichslösungen ermittelt werden kann. Durch die subjektive Beurteilung entstehen auch hier erhebliche Fehler.

Die Methode von A n s o n ermöglicht es, die Menge der Spaltprodukte zu bestimmen. Gute Ergebnisse werden nur bei Substratüberschuß und kurzen Versuchszeiten erhalten. Dann besteht aber exakte Proportionalität zwischen Fermentmenge und Extinktion. Die Reproduzierbarkeit ist ausgezeichnet und die Fehlergrenze beträgt etwa $\pm 2,5\%$. Die Methode ist auch in Reihenversuchen rasch durchführbar. Außer einem Photometer sind keine weiteren Hilfsmittel erforderlich. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß das Phenol-Reagens sehr vorsichtig aufbewahrt und bei einer Veränderung die Eichkurve überprüft werden muß. Das Reagens reagiert sehr leicht mit reduzierenden Substanzen, wie H_2S , Glutathion usw. Dieser Fehler wird bei der modifizierten Methode von B e r g s t e r - m a n n dadurch ausgeschlossen, daß die Lichtabsorption des Trichloressigsäurefiltrates ohne Zugabe des Phenol-Reagens bei $280\ m\mu$ bestimmt wird. Nach N o r t h r o p, K u n i t z und H e r r i o t t kann bei ungereinigten Enzymlösungen nicht bei $280\ m\mu$ gemessen werden.

Zuletzt bestimmten wir den Pepsingehalt noch mit der von T o m a r e l l i, C h a r n e y und H a r d i n g angegebenen Methode. Wir möchten sie als Methode der Wahl bezeichnen. Man erhält sehr schnell genaue Ergebnisse. Da die Methode sehr leicht auszuführen ist und zur Bestimmung nur ein Photometer erforderlich ist, kann sie ohne weiteres für Reihenversuche verwendet werden.

M a g e r und F a r m e r (46) finden, daß die Spaltung von Äzoalbumin nur dann als Reaktion erster Ordnung verläuft, wenn der $\log \frac{c_1}{c_2}$ über 0,04 hinausgeht. Sie inkubieren nur 10 Minuten, da sie bei längerer Inkubationszeit Abweichungen vom linearen Verlauf der Reaktion beobachten.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Es wurde eine Reihe von proteolytischen Handelspräparaten auf ihren Pepsingehalt mit folgenden Methoden untersucht:
 - a. Methode des D.A.B.6
 - b. Methode des D.A.B.6 modifiziert von B ö r n g e n
 - c. Methode der Pharmacopoea Helvetica V
 - d. Methode der Pharmacopoea Helvetica V modifiziert von H o r s c h und K ö n i g
 - e. Anson-Methode
 - f. Anson-Methode modifiziert von B e r g s t e r m a n n
 - g. Methode von T o m a r e l l i, C h a r n e y und H a r d i n g.
2. Die Methoden des D.A.B.6 und der Pharmacopoea Helvetica sind zur Testung von Pepsinpräparaten unzureichend, da eine quantitative Erfassung des Pepsins nicht möglich ist.
3. Besonders geeignet zur quantitativen Pepsinbestimmung sind die Methoden nach A n s o n, A n s o n modifiziert nach B e r g s t e r m a n n und T o m a r e l l i, C h a r n e y und H a r d i n g.
4. Wegen der leichten Durchführbarkeit wird für Reihenversuche besonders die Methode von T o m a r e l l i, C h a r n e y und H a r d i n g empfohlen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Abelin, J. u. H. Pfister: Klin. Wschr. 30, 1036 (1952)
- 2) Anson, M.L.: J.gen.Physiol. 22, 265 (1932)
- 3) Arrhenius, S.v.: Immunochemie
von W. Finkelstein 1907, Leipzig,
Akademische Verlagsgesellschaft
- 4) Beazell, J.M., R.L. Schmidt,
A.C.Ivy u. J.F. Monaghan Amer. J. digest. Dis. 5, 661 (1938)
- 5) Benrath, A.: Ztschr.f.physik. Chem. 67, 501 (1908)
- 6) Bergmann, M. et al.: Advances Enzymology 2, 49 (1942)
- 7) Bergmann, M. u. J. Fruton: J.Biol.Chem. 117, 189 (1937)
- 8) Bergstermann, H.: Münch.med.Wschr. 96, 560 (1954)
- 9) Bonorino, U.C., H.Zunino Arch. argent.Enferm. Apar. digest.
u. J.J. Lacour: 10, 335 (1935)
- 10) Börngen, S., K. Gebler u.
F. Hauschild: Die Pharmazie 10, 230 (1955)
- 11) Bucher, G.R.: Gastroenterol.Baltimore 8, 5 (1947)
- 12) Bucher, G.R., M.J. Grossmann
u. A.G. Ivy: Gastroenterol. 5, 501 (1945)
- 13) Buchs, S.: Die Biologie des Magenkathepsins
Basel New York 1947
- 14) Buchs, S.: Enzymologia 13, 208 (1949)
- 15) Calvery, H.O. u. E.D. Schoek: J. biol. Chem.(Am.) 113, 15 (1936)
- 16) Courtois, J.E. u.
H. Villiers-Huiban: Ann. pharmac.franc. 14, 639 (1956)
- 17) Damodaran, M. u. P.S.Krishnan: Biochem.J.(Brit.) 32, 1919 (1918)
- 18) Ege, R. u. J. Obel: Biochem.Z. 280, 265 (1935)
- 19) Eschenbrenner, H.: Süddeutsche Apotheker-Zeitg. 89, 413
(1949)
- 20) Flaschenträger, B. u. E. Lehn-
nartz: Physiologische Chemie, Springer-Verlag,
1, 1120 (1951) Berlin
- 21) Flaschenträger, B. u. E. Lehnartz: 1, 1146 (1951)
- 22) Flaschenträger, B. u. E. Lehnartz: 1, 1145 (1951)
- 23) Flaschenträger, B. u. E. Lehnartz: 1, 1124 (1951)
- 24) Folin, O. u. V. Ciocalteu: J. Biol.Chem. 73, 627 (1927)
- 25) Fruton, J.S. u. M.Bergmann: Science N.Y. 87, 537 (1938)
- 26) Fruton, J.S. u. M. Bergmann: J. biol. Chem. 141, 763 (1941)

- 27) Galleotti, G.: Ztschr.f.physik.Chem. 76, 105 (1911)
Ztschr.f.physik.Chem. 80, 241 (1912)
- 28) Groll, J.T.: Arch. neerl. Physiol. 28, 527 (1947)
- 29) Groß, O.: Berl.klin.Wschr. 13, 643 (1908)
- 30) Groy, S.J., J.A. Benson jr. Proc.Soc.Exper.Biol. a.Med. 78, 338
u. R.W. Reifstein: (1951)
- 31) Harington, C.R. u.R.V.Rivers: Biochem.J. 38, 417 (1944)
- 32) Heilmeyer, L.: Lehrbuch d. spez.Path. Physiologie, 9.
Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
S. 335
- 33) Henri, V.: Lois générales de l'action des
diastases-Thèse Paris 1903
- 34) Horsch, W. u.K. König: Die Pharmazie 11, 195 (1956)
- 35) Hunt, J.N.: Biochem.J. 42, 104 (1948)
- 36) Janicki, J.: Biochem.Z. 289, 348 (1937)
- 37) Janowitz, H.D. u.F.Hollander: J. Appl. Physiol. 4, 53 (1951)
- 38) Kälin, B.: Kommentar zur Pharm.Helv. V
Zürich 1947
- 39) Kazmeier, F.u.C.Stahlberg: Klin.Wschr. 32, 85 (1954)
- 40) Köhrmann, K.H.: Deutsch.Apotheker-Ztg. 91, 263 (1951)
- 41) Kupelwieser, E.: Biochem.Z. 131, 413 (1922)
- 41a) Krijgsmann, B.J.: Ztschr.physik.Chemie 227, 252 (1934)
- 42) Linderström-Lang, K.: Ztschr.physiol.Chem. 173, 32 (1928)
- 43) Linderström-Lang, K. u.
Holter, H.: Ztschr.physiol.Chem. 201, 9 (1931)
- 44) Linderström-Lang, K. u.
H. Holter: Ztschr.physiol.Chem. 204, 15 (1932)
- 45) Linderström-Lang, K. u.
H. Holter: Ergebn.Enzymforsch. 3, 309 (1934)
- 46) Mager, M. u.D.A.Farmer: J.Labor.a.Clin.Med. 42, 915 (1953)
- 47) Massart, L.: Sumner, J.B.u.K.Myrbäck I/1, 307
The Enzymes I New York 1950
- 48) Masch, L.W. u. J.Otte-Huchting: Arzneimittelforschung 7, 12 (1957)
- 49) Masch, L.W. u.J.Otte-Huchting: Ztschr.phys.Chem. 301, 49 (1955)
- 50) Merten, R., W.Kleffner u.
H. Ratzer: Ztschr.klin.Med. 146, 383 (1950)
- 51) Merten, R. u. H. Ratzer: Dtsch.Ztschr.f.Verdaunungs- und Stoffwechsel-
krankheiten 10, 86 (1950)
- 52) Mett, M.S.: Arch. Anat.u.Physiol. 1894, 68
- 53) Michaelis, L. u.M.L.Menten: Biochem.Ztschr. 49, 333 (1913)

- 54) Michaelis, L. u. M. Rothstein: Biochem. Ztschr. 105, 60 (1920)
- 55) Moelwyn-Hughes, E.A.: Handb.d.Enzymologie S. 254
- 56) Moelwyn-Hughes, E.A.: Sumner-Myrbäck I/1, 60
The Enzymes I, New York 1950
- 57) National Formulary 9 th ed.: Mach Publishing Co Easton Pa 1950, 372
- 58) Northrop, J.H.: J.gen.Physiol. 5, 263 (1922)
- 59) Northrop, J.H.: J.gen.Physiol. 18, 459 (1923)
- 60) Northrop, J.H.: Crystalline Enzymes Columbia University
1939
- 61) Northrop, J.H. u. M. Kunitz: J.gen.Physiol. 16, 313 (1932)
- 62) Orringer, D., U. Lauber u.
F. Hollander: Science (Lancaster, Pa.) 111, 98 (1950)
- 63) Rauen, H.M.: Biochem.Taschenb. 975 (1956)
Springer Verlag, Berlin
- 64) Reiss, E.: Schweiz.med.Wschr. 29, Nr. 13 (1923)
- 65) Rona, P. u. H. Kleinmann: Biochem.Ztschr. 140, 461 (1933)
- 66) Rona, P. u. N. Neuenschwander-
Lemmer: Biochem.Ztschr. 235, 215 (1931)
- 67) Schmidt, A. u. J. Strasburger: Die Fäzes des Menschen, Bln., 1903
- 68) Schorer, G.: Inaug.-Dissert. Bern 1908
- 69) Slyke van, D.D.: Ber.chem.Ges. 43, 3170 (1910)
83, 425 (1929)
- 70) Sörensen, S.P.L.: Biochem.Ztschr. 7, 45 (1908)
- 71) Speyer, E.: Arzneimittelforschung 3, 30 (1953)
- 72) Spriggs, K.: Ztschr.physiol.Chem. 35, 465 (1902)
- 73) Springer, G.F.: Biochem.Ztschr. 321, 107 (1951)
- 74) Tomarelli, R., J. Charney u.
M. Harding: J.Lab.clin.Med. 34, 428 (1949)
- 75) Tullis, J.L., Blood Cells and Plasma Proteins S. 203 Acad.Press
New York 1953
- 76) Wallenfels, K.: Biochem.Ztschr. 321, 189 (1950)
- 77) Wallenfels, K.: Biochem.Ztschr. 321, 389 (1950)
- 78) Wesselmann, H.: J.Am.Pharmaceutical Association
Vol XLV June 1956 p. 387
- 79) White, F.D. u. D.E. Bowann: Canadian J. of Res. 25, 153 (1947)
- 80) Willstätter, R. u. E. Wald-
schmid-Leitz: Ztschr.physiol.Chem. 132, 181 (1924)
- 81) Wovley, D.W.: Adv.Enzymol. 6, 129 (1946)

Herrn Professor Dr. K. Z i p f danke ich für die
freundliche Überlassung des Themas.

Dem wissenschaftlichen Assistenten Herrn Dr. W.
Schlemmer bin ich für seine bereitwillig geleis-
tete Beratung zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 25. Juli 1932 wurde ich, Albert Hellmeier, als Sohn des Tierheilkundigen Albert Hellmeier und seiner Ehefrau Anna, geb. Reischl, in Fahrenzhausen, Landkreis Dachau, geboren.

Nach 5 Klassen Volksschule in Fahrenzhausen trat ich 1943 in die Oberschule in Freising über und legte dort im Juli 1952 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1952/53 begann ich das Studium der Tierheilkunde an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München und bestand dort im Juli 1957 das tierärztliche Staatsexamen. Seit Ableistung meiner Praktikantenzeit bin ich als Assistent tätig.

